



TITLE:

Biochemical Analysis on the Interaction of Human Matrix Metalloproteinase 7 and Thermolysin with 8-Anilinoanthracene 1-Sulfonate, Heparin, and Cholesterol Sulfate(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

VIMBAI, NETSAI CHARITY SAMUKANGE

CITATION:

VIMBAI, NETSAI CHARITY SAMUKANGE. Biochemical Analysis on the Interaction of Human Matrix Metalloproteinase 7 and Thermolysin with 8-Anilinoanthracene 1-Sulfonate, Heparin, and Cholesterol Sulfate. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19017>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	VIMBAI NETSAI CHARITY SAMUKANGE
論文題目	Biochemical Analysis on the Interaction of Human Matrix Metalloproteinase 7 and Thermolysin with 8-Anilidonaphthalene 1-Sulfonate, Heparin, and Cholesterol Sulfate (ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ7およびサーモライシンと8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、ヘパリンおよびコレステロール硫酸の相互作用に関する生化学的解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ 7 (MMP-7) は大腸癌や前立腺癌などで過剰な発現が認められているマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) である。MMP-7 は分子量 19,000 のタンパク質 (173 アミノ酸残基) であり、活性に必須な 1 個の亜鉛イオン、安定性に必要な 1 個の亜鉛イオンおよび 2 個のカルシウムイオンを含有する。MMP-7 は生理的条件下では、ヘパリンなどの硫酸化グリコサミノグリカンおよびコレステロール硫酸などの硫酸化脂質と結合することにより、細胞外マトリックスを分解する。サーモライシン (TLN) は中等度好熱菌 <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> が菌体外に生産する好熱性メタロプロテイナーゼである。TLN は分子量 34,600 のタンパク質 (316 アミノ酸残基) であり、1 分子あたり活性に必須な 1 個の亜鉛イオンと安定性に必要な 4 個のカルシウムイオンを含有する。TLN は、加水分解の逆反応を利用して人工甘味剤アスパルテムの前駆体である <i>N</i>-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (ZDFM) をはじめとするペプチドの合成に広く応用されてきた。TLN の活性と安定性は中性塩の添加により増大することが知られている。8-anilidonaphthalene 1-sulfonate (8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、ANS) は、アニリノナフチル基がタンパク質と疎水性相互作用により結合すると蛍光を発するため、蛍光プローブとしてタンパク質との相互作用解析に広く用いられている。本論文は、MMP-7 の ANS、ヘパリンおよびコレステロール硫酸 (CS) との相互作用並びに TLN の ANS との相互作用を解析した結果をまとめたものであり、以下の 3 章よりなっている。</p>			
<p>第 1 章では、MMP-7 と ANS の相互作用を解析した。ANS は pH 4.5-9.5 では、合成基質 (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[<i>N</i>³-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl]-L-Ala-L-Arg-NH₂ (MOCaC-PLGL(Dpa)AR) に対する MMP-7 の加水分解活性を非拮抗的に阻害した。pH 7.5 では、阻害物質定数 (<i>K</i>_i) は 110±20 μM であった。MMP-7 は pH 3.5 では活性を失った。ANS の蛍光は、pH 4.5-9.5 では MMP-7 を添加しても変化しなかったが、pH 3.5 では MMP-7 の添加により増大した。これらの結果から、pH 4.5-9.5 では ANS のスルホン酸基が MMP-7 と静電的相互作用により結合するが、pH 3.5 では ANS のアニリノナフチル基が MMP-7 と疎水性相互作用により結合</p>			

することが示唆された。

第2章では、MMP-7 の硫酸化グリコサミノグリカンおよび硫酸化脂質との相互作用についての知見を得るために、MMP-7 とヘパリンおよび CS の相互作用を解析した。MMP-7 の MOCAc-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性はヘパリン濃度の増加 (0 μM から 50 μM) に伴い増大した。この増大はミカエリス定数 (K_m) の低下によるものであり、ヘパリン濃度が 0 μM および 50 μM のときの K_m 値はそれぞれ $57 \pm 8 \mu\text{M}$ および $19 \pm 5 \mu\text{M}$ であった。CS はこの活性を非拮抗的に阻害し、 K_i 値は $11 \pm 3 \mu\text{M}$ であった。ヘパリンは 50°C から 70°C の熱処理による MMP-7 の活性低下を抑制したが、CS はこれを亢進させた。これらの結果から、ヘパリンは MMP-7 の活性と安定性を増大させるが、CS はこれらを減少させることが示された。

第3章では、TLN の活性と安定性が中性塩により向上する機構を調べるために、TLN と ANS の相互作用を ANS の蛍光により解析した。pH 7.5 では ANS の蛍光が TLN の添加により増大し短波長側にシフトしたことから、疎水性相互作用により ANS のアニリノナフチル基と TLN が結合することが示された。ANS は TLN の MOCAc-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性を変化させなかった。pH 7.5 での TLN と ANS の解離定数 (K_d) は 0 M NaCl では $33 \pm 2 \mu\text{M}$ であり、NaCl 濃度の増加に伴い減少し、4 M NaCl では $9 \pm 3 \mu\text{M}$ であった。NaCl を添加しないときの K_d 値は pH 5.5-8.5 では一定 ($31-34 \mu\text{M}$) であった。これらの結果から、 Na^+ や Cl^- が TLN の分子表面に結合すると、ANS の TLN への結合に影響を与えることが示唆された。このような中性塩の TLN 分子表面への結合が、TLN の活性化や安定化のひとつの要因であることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は亜鉛プロテイナーゼと硫酸基含有物質の相互作用の解析に関するもので、癌で過剰発現が認められているヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ 7 (MMP-7) については、生理条件下での作用機構を明らかにするために、8-anilinonaphthalene 1-sulfonate (8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸、ANS)、ヘパリンおよびコレステロール硫酸 (CS) との相互作用を解析した。また、産業酵素であるサーモライシン (TLN) については、中性塩による活性化・安定化の機構を明らかにするために、ANS との相互作用について解析した。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. MMP-7 と ANS の相互作用を解析し、ANS の蛍光は pH 4.5-9.5 では MMP-7 を添加しても変化しないが、pH 3.5 では MMP-7 の添加により増大することを見出した。このことから、pH 4.5-9.5 では ANS のスルホン酸基が MMP-7 と静電的相互作用により結合するが、pH 3.5 では ANS のアニリノナフチル基が MMP-7 と疎水性相互作用により結合することを示唆した。
2. MMP-7 とヘパリンおよび CS の相互作用を解析したところ、合成基質 (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-L-Pro-L-Leu-Gly-L-Leu-[*N*³-(2,4-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl]-L-Ala-L-Arg-NH₂ (MOCAC-PLGL (Dpa) AR) に対する MMP-7 の加水分解活性はヘパリン濃度の増加に伴い増大した。この増大はミカエリス定数 (K_m) の低下によることを見出した。また、CS はこの活性を非拮抗的に阻害することを見出した。さらに、ヘパリンは 50℃から 70℃の熱処理による MMP-7 の活性低下を抑制するが、CS はこれを亢進させることを見出した。これらのことから、ヘパリンは MMP-7 の活性と安定性を増大させるが、CS はこれらを減少させることを示した。
3. TLN と ANS の相互作用を解析し、ANS のアニリノナフチル基が TLN と疎水性相互作用により結合することと、ANS は TLN の MOCAC-PLGL (Dpa) AR 加水分解活性を変化させないことを見出した。また、TLN と ANS の解離定数 (K_d) は NaCl 濃度の増加に伴い減少するが、pH 5.5-8.5 では一定であることを見出した。これらのことから、Na⁺ や Cl⁻ が TLN の分子表面に結合すると、ANS の TLN への結合に影響を与えること、およびこのような中性塩の TLN 分子表面への結合が、TLN の活性化や安定化のひとつの要因であることを示唆した。

以上のように、本論文は、MMP-7 の生理的条件下での作用機構および TLN の中性塩による活性化・安定化の機構を明らかにしたものであり、酵素化学、生命有機化学、農産製造学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 27 年 1 月 9 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)